

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-039401

(43)Date of publication of application : 08.02.2000

(51)Int.Cl.

G01N 21/77  
 G01N 21/27  
 G01N 33/543  
 G01N 33/547  
 // G01N 33/545  
 G01N 33/553

(21)Application number : 11-012233

(71)Applicant : DAINIPPON PRINTING CO LTD  
 KARUBE MASAO

(22)Date of filing : 20.01.1999

(72)Inventor : NAKAMURA RUNA  
 NAKAMURA HIROYUKI  
 NAGATA RYOHEI  
 KARUBE MASAO  
 ROKUSHA HITOSHI

(30)Priority

Priority number : 10076144  
 10134780

Priority date : 24.03.1998  
 18.05.1998

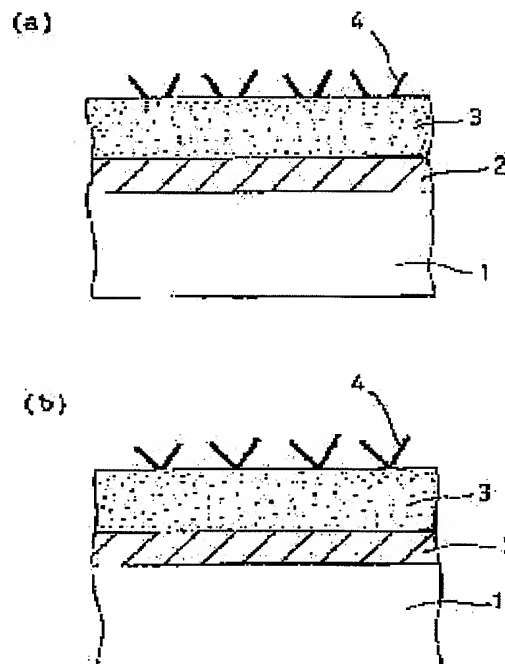
Priority country : JP  
 JP

## (54) MEASUREMENT CELL FOR SURFACE PLASMON RESONANCE BIOSENSOR AND ITS MANUFACTURE

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain improved sensitivity even if a physiologically activated substance is available in small quantity, by providing a plasma polymerization film being formed on a metal film and a layer consisting of the physiologically activated substance being immobilized on the surface at an optical part.

**SOLUTION:** In a measurement cell, a transparent substrate 1, a metal thin film 2 formed on it, a plasma polymerization film 3 formed on the metal thin film 2, and a physiologically activated substance 4 immobilized on the surface are provided at an optical part. The transparent substrate 1 consists of a material transparent to glass and a laser beam as thick as approximately 0.1-5 mm, and generates surface plasmon resonance in the metal thin film 2, using gold, silver, platinum, and the like. and the film thickness is especially preferably 100-500 Å. Also, the plasma polymerization film 3 is three-dimensionally crosslinked by performing the plasma polymerization of a monomer raw material, and the monomer raw material should be such that the physiologically activated substance 4 can be immobilized by plasma polymerization. In the physiologically activated substance 4 consisting of nucleic acid, non-immunoprotein, or the like, either an Fab fragment or an F(ab') fragment is directly immobilized to the plasma polymerization film 3, thus improving sensitivity and a reaction speed.



**\* NOTICES \***

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]This invention relates to the measuring cell used for a surface-plasmon-resonance biosensor and it, and the manufacturing method of the measuring cell.

[0002]

[Description of the Prior Art]Although many measurement which used immunoreaction by the clinical laboratory test etc. is performed now, In the conventional method, the immune sensor using the surface plasmon resonance (SPR) which can detect change of ligand to high sensitivity is used, without needing a marker, since complicated operation and marker are needed. The intensity of the monochromatic light in which glass etc. were optically reflected from the boundary of a transparent substance and metallic thin film layer depends the phenomenon of this surface plasmon resonance on it being dependent on the refractive index of the sample in the metal's outgoing radiation side.

Therefore, a sample can be analyzed by measuring the intensity of the reflected monochromatic light.

[0003]The optical part of the measuring cell generally used with the measuring device (surface-plasmon-resonance biosensor) using this surface plasmon resonance has structure as shown in drawing 2. That is, the porous material 5 is formed on the metal thin film 2 formed on the glass substrate 1, and the physiological active substances 4, such as an enzyme and an antibody, are being supported or fixed to the surface and the inside of this porous material 5. As this porous material 5, the textiles, knitting and the nonwoven fabric which consist of a synthetic fiber, a natural fiber, an inorganic fiber, etc., for example, porous inorganic matter, organic materials, etc. are used (refer to JP,3-164195,A). In the commercial item (the object for BIAcore 2000, the Pharmacia biosensor company make), carboxymethyl dextran is used as this porous material 5.

[0004]However, since the physiological active substance 4 which interacts with a measuring object substantially is only what exists in the surface of the porous material 5, the physiological active substance 4 currently supported or fixed to the inside of the porous material 5 serves as a diffusion limitation depending on conditions, and the part reaction efficiency will fall. Although the LB (Langmuir-Blodgett) method may be used as a method of fixing the physiological active substance 4 to the metal thin film 2 (refer to JP,5-288672,A), there is a problem that combination with LB film and a metal thin film is weak, and drops out with a physiological active substance.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]The technical problem of this invention is providing the surface-plasmon-resonance biosensor which uses the manufacturing method of providing the measuring cell for surface-plasmon-resonance biosensors from which good sensitivity is obtained, and its measuring cell, and its measuring cell, even if the physiological active substance to fix is little.

[0006]

[Means for Solving the Problem]When this invention persons fixed a physiological active substance via a plasma polymerization film in view of an aforementioned problem as a result of research wholeheartedly, even if a physiological active substance to be used was little, it found out that good sensitivity was obtained, and this invention was completed. This invention is a measuring cell for surface-plasmon-resonance biosensors, wherein a layer which consists of a metal membrane, a plasma polymerization film formed on this metal membrane, and a physiological active substance fixed to the surface of this plasma polymerization film is provided in an optical part.

[0007]This invention is a surface-plasmon-resonance biosensor which uses the above-mentioned

measuring cell for surface-plasmon-resonance biosensors. This invention is a manufacturing method of a measuring cell for surface-plasmon-resonance biosensors which forms a plasma polymerization film on this metal membrane, and is characterized by subsequently to the surface of this plasma polymerization film fixing a physiological active substance, after forming a metal membrane on a transparent substrate optically.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-39401

(P2000-39401A)

(43) 公開日 平成12年2月8日(2000.2.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
G 0 1 N 21/77		G 0 1 N 21/77	B
21/27		21/27	C
33/543	5 2 5	33/543	5 2 5 U
	5 9 5		5 9 5
33/547		33/547	

審査請求 未請求 請求項の数59 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-12233  
(22) 出願日 平成11年1月20日(1999.1.20)  
(31) 優先権主張番号 特願平10-76144  
(32) 優先日 平成10年3月24日(1998.3.24)  
(33) 優先権主張国 日本 (J P)  
(31) 優先権主張番号 特願平10-134780  
(32) 優先日 平成10年5月18日(1998.5.18)  
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002897  
大日本印刷株式会社  
東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号  
(71) 出願人 591086706  
軽部 征夫  
神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地16  
(72) 発明者 中村 瑠奈  
東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号  
大日本印刷株式会社内  
(74) 代理人 100091096  
弁理士 平木 祐輔 (外1名)

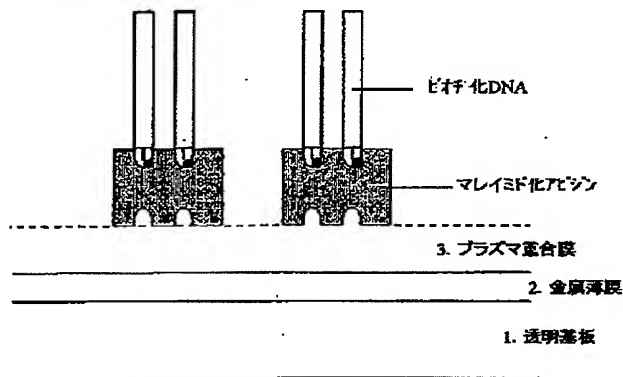
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明の課題は、固定化する生理活性物質が少量であっても、良好な感度が得られる表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルを提供すること、ならびにその測定セルの製造方法及びその測定セルを使用した表面プラズモン共鳴バイオセンサーを提供することである。

【解決手段】 プラズマ重合膜を介して生理活性物質を固定化すれば、使用する生理活性物質が少量であっても良好な感度が得られることを見出し、本発明を完成した。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成された少なくとも 1 層以上のプラズマ重合膜とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 2】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された核酸とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 3】 前記核酸が DNA、RNA 又は PNA のいずれかであることを特徴とする、請求項 2 記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 4】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された非免疫性蛋白質とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 5】 前記非免疫蛋白質が、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン又はレセプターのいずれかであることを特徴とする、請求項 4 記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 6】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された免疫グロブリン結合性タンパク質とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 7】 前記免疫グロブリン結合性タンパク質がプロテイン A、プロテイン G 又はリウマチ因子のいずれかであることを特徴とする、請求項 6 記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 8】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された糖結合性タンパク質とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 9】 前記糖結合性タンパク質がレクチンであることを特徴とする、請求項 8 記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 10】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成さ



で表される化合物及び/又は、下記の式(2)



で表される化合物であることを特徴とする、請求項 17

れたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された糖を認識する糖鎖とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 11】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された脂肪酸もしくは脂肪酸エステルとからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

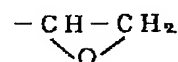
【請求項 12】 前記脂肪酸もしくは脂肪酸エステルがステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、ステアリン酸エチル、アラキジン酸エチルまたはベヘン酸エチルのいずれかであることを特徴とする、請求項 11 記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 13】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定されたリガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドとからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 14】 前記ポリペプチドもしくはオリゴペプチドが、遺伝子工学的的手法あるいは化学合成法を用いて作製されたことを特徴とする、請求項 13 記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 15】 前記プラズマ重合膜が -COOH 基、-CHO 基、-SH 基、-NH<sub>2</sub> 基、-OH 基、=NH 基、-CONH<sub>2</sub> 基、-NCO 基、-CH=CH<sub>2</sub> 基、=C=O 基又は

【化 1】

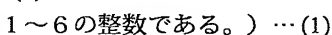


のいずれか 1 又は 2 以上を含むことを特徴とする、請求項 1～14 のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 16】 前記プラズマ重合膜が 2 層以上の多層構造をなすことを特徴とする請求項 1～14 のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 17】 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、窒素を含む化合物であることを特徴とする、請求項 1～14 のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項 18】 前記窒素を含む化合物が、下記の式(1)



で表される化合物であることを特徴とする、請求項 17 記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

10

20

30

40

50

【請求項19】 前記窒素を含む化合物が、ピリジン、エチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン、*n*-プロピルアミン、モノエチルアミン、トリエチルアミン、ジエチルアミン、アリルアミン、アクリルアミド、アニリン、アクリロニトリル、1,2,4-トリアゾール、5-アミノ-1*H*-テトラゾール、プロパルギルアミン又はアセトニトリルのいずれかであることを特徴とする、請求項17記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

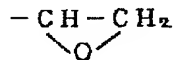
【請求項20】 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、硫黄を含む化合物であることを特徴とする、請求項1～14のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項21】 前記硫黄を含む化合物が、硫化ジメチル、二硫化メチル、エタントチオール、エタンジチオール、チオフェン、メルカプトエタノール又はジスレイトールのいずれかであることを特徴とする、請求項20記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項22】 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、ハロゲンを含む化合物であることを特徴とする、請求項1～14のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項23】 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、-COOH基、-CHO基、-SH基、-NH<sub>2</sub>基、-OH基、=NH基、-CONH<sub>2</sub>基、-NCO基、-CH=CH<sub>2</sub>基、=C=O基又は

【化2】



のいずれか1又は2以上を同一分子内に含むことを特徴とする、請求項1～14のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項24】 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、-OH基を含むものであって、この-OH基がプロパルギルアルコールであることを特徴とする、請求項23に記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項25】 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、C及びHからなる炭化水素化合物であることを特徴とする、請求項1～14のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項26】 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、有機金属化合物であることを特徴とする、請求項1～14のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項27】 前記有機金属化合物が有機ケイ素化合物であることを特徴とする、請求項26記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項28】 前記有機ケイ素化合物がテトラメチルシラン、テトラメチルジシロキサン、ヘキサメチルジシロキサン、ヘキサメチルジシラザン、ヘキサメチルシクロトリシラザン、ジエチルアミノトリメチルシラン、ト

リメチルビニルシラン、テトラメトキシシラン、アミノプロピルトリエトキシシラン、オクタデシルジエトキシメチルシラン、ヘキサメチルジシラン又はジビニルテトラメチルジシロキサンのいずれかであることを特徴とする、請求項27記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項29】 前記プラズマ重合膜に、重合性あるいは非重合性モノマー原料によりプラズマ処理を施すことを特徴とする、請求項1～14のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項30】 前記非重合性モノマー原料が窒素、アンモニア、ヒドラジン、硫化水素、二硫化水素、酸素、水素、水、ハロゲンガス又は希ガスのいずれかであることを特徴とする、請求項29記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項31】 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、請求項17～30記載のものの2種以上混合したものであることを特徴とする、請求項1～14のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項32】 前記プラズマ重合膜の表面に固定するものが免疫性蛋白質又は酵素であり、前記プラズマ重合膜のモノマー原料がピリジン、トリエチルアミン、ジエチルアミン、アリルアミン、アクリルアミド、アニリン、アクリロニトリル、1,2,4-トリアゾール、5-アミノ-1*H*-テトラゾール又はアセトニトリルのいずれかであることを特徴とする、請求項1記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項33】 前記プラズマ重合膜の表面に固定するものが免疫性蛋白質又は酵素であり、前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、請求項20～31項記載のいずれかに記載されたものであることを特徴とする、請求項1記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項34】 前記免疫性蛋白質が抗体であることを特徴とする請求項32または33記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項35】 前記抗体のF<sub>a</sub>bフラグメントがプラズマ重合膜の表面に固定されていることを特徴とする請求項34記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項36】 前記抗体のF<sub>(a b)<sub>2</sub></sub>フラグメントがプラズマ重合膜の表面に固定されていることを特徴とする請求項35記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項37】 前記プラズマ重合膜と前記核酸との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、請求項2又は3記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項38】 前記プラズマ重合膜と前記非免疫蛋白質との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形

成した層が設けられていることを特徴とする、請求項4又は5記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項39】 前記プラズマ重合膜と前記免疫グロブリン結合性蛋白質との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、請求項6又は7記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項40】 前記プラズマ重合膜と前記糖結合性蛋白質との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、請求項8又は9記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項41】 前記プラズマ重合膜と前記糖を認識する糖鎖との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、請求項10記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項42】 前記プラズマ重合膜と前記脂肪酸もしくは脂肪酸エステルとの間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、請求項11記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項43】 前記プラズマ重合膜と前記リガンド結合能を有するポリペプチドあるいはオリゴペプチドとの間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、請求項13又は14記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項44】 前記架橋試薬が、グルタルアルデヒド、過ヨウ素酸、N-スクシニミジル-2-マレイミド酢酸、N-スクシニミジル-4-マレイミド酪酸、N-スクシニミジル-6-マレイミドヘキサノ酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドメチルシクロヘキサノ-1-カルボン酸、N-スルホスクシニミジル-4-マレイミドメチルシクロヘキサノ-1-カルボン酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドメチル安息香酸、N-スクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-スルホスクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドフェニル-4-酪酸、N-スルホスクシニミジル-4-マレイミドフェニル-4-酪酸、NN-オキシジメチレン-ジマレイミド、NN-0-フェニレン-ジマレイミド、NN-m-フェニレン-ジマレイミド、NN-p-フェニレン-ジマレイミド、NN-ヘキサメチレン-ジマレイミド、N-スクシニミジルマレイミドカルボン酸、N-スクシニミジル-S-アセチルメルカプト酢酸、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、S-アセチルメルカプトスクシニクアンヒドライド、メチル-3-(4-ジチオピリジル)プロピオニミデート、メチル-4-

メルカプトブチルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオニミデート、イミノチオレン、0-カルボキシメチル-ヒドロキシルアミン、アゾジフェニルビルマレイミド、ビス(スルホサクシニイミジル)スペレイト、4,4-ジイソチオシアノ-2,2-ジスルホン酸スチルベン、4,4-ジフルオロ-3,3-ジニトロジフェニルスルホン、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン、p-フェニレンジイソチオシアネイト、ジメチルアジピミデート、ジメチルピメルイミデート、ジメチルスベルイミデート、p-アジドフェナシルプロマイド、p-アジドフェニルグリオキサール、N-ヒドロキシサクシニイミジル-4-アジドベンゾエイト、4-フルオロ-3-ニトロフェニルアジド、メチル-4-アジドベンゾイミデート、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシイミド、N-スクシイミジル-6-(4-アジド-2-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエイト、1,4-ベンゾキノン、N-スクシニイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、N-(4-マレイミドブチリロキシ)スルホスクシニイミドナトリウム塩、N-(6-マレイミドカプロイロキシ)スルホスクシニイミドナトリウム塩、N-(8-マレイミドカプロイロキシ)スルホスクシニイミドナトリウム塩、N-(11-マレイミドウンデカノイロキシ)スルホスクシニイミドナトリウム塩、N-[2-(1-ピペラジニル)エチル]マレイミド二塩酸、ビスジアゾベンジジン、ヘキサメチレンジイソシアネート、トルエンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N-エチレンビスマレイニイミド、N,N-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、2,4-ジニトロベンゼンスルフォネートナトリウム塩、ジアゾ化合物あるいは縮合試薬が $RN=C=NR$ (又は $R$ )で表されるカルボジイミド誘導体、N-ヒドロキシスクシイミド、トリ-n-ブチルアミン、ブチルクロロフォルメーテ、イソブチルイソシアニドからなる群から選ばれた少なくとも1または2以上であることを特徴とする、請求項37~43のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項45】 前記プラズマ重合膜と前記免疫性蛋白質又は酵素との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬水溶性により形成した層が設けられていることを特徴とする、請求項32~36のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項46】 前記架橋試薬が、N-スクシニミジル-4-マレイミドメチル安息香酸、N-スクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドフェニル-4-酪酸、NN-オキシジメチレン-ジマレイミド、NN-m-フェニレン-ジマレイミド、NN-p-フェニレン-ジマレイミド、NN-ヘキサメチレン-ジマレイミド、N-スクシニミジルマレイミドカルボン酸、N-スクシニミジル-S-アセチル

メルカプト酢酸、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジリジチオ)プロピオネート、S-アセチルメルカプトスクシニクアンヒドライド、メチル-3-(4-ジチオピリジル)プロピオニミデート、メチル-4-メルカプトブチルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオニミデート、イミノチオレン、0-カルボキシメチル-ヒドロキシルアミン、アゾジフェニルビルマレイミド、ビス(スルホサクシニイミジル)スペレイト、4,4-ジイソチオシアノ-2,2-ジスルホン酸スチルベン、4,4-ジフルオロ-3,3-ジニトロジフェニルスルホン、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン、p-フェニレンジイソチオシアネート、ジメチルアジピミデート、ジメチルピメルイミデート、ジメチルスベルイミデート、p-アジドフェナシルプロマイド、p-アジドフェニルグリオキサール、N-ヒドロキシサクシニイミジル-4-アジドベンゾエイト、4-フルオロ-3-ニトロフェニルアジド、メチル-4-アジドベンゾイミデート、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシイミド、N-スクシイミジル-6-

(4-アジド-2-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエイト、1,4-ベンゾキノン、N-スクシニイミジル-3-(2-ピリジリジチオ)プロピオネート、ビスアゾベンジジン、ヘキサメチレンジイソシアネート、トルエンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N-エチレンビスマレイニイミド、N,N-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、ジアゾ化合物あるいは縮合試薬が $RN=C=NR$ (又は $R$ )で表されるカルボジイミド誘導体、N-ヒドロキシスクシイミド、トリ-n-ブチルアミン、ブチルクロロフォルメーテ、イソブチルイソシアニドからなる群から選ばれた少なくとも1または2以上であることを特徴とする、請求項45記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項47】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定される物質と、さらにその上にプラズマ重合膜あるいはプラズマ処理を施した層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項48】 前記固定される物質が請求項2~13又は32に記載されたものであることを特徴とする請求項47記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項49】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成された少なくとも1層以上のプラズマ重合膜とからなる層が光学部分に設けられており、該プラズマ重合膜に疎水結合により物質が固定されていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項50】 前記固定された物質が請求項2~13又は32に記載されたものであることを特徴とする請求項49記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【請求項51】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に核酸を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【請求項52】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に非免疫蛋白質を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【請求項53】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に免疫グロブリン結合性蛋白質を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【請求項54】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に糖結合性蛋白質を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【請求項55】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に糖を認識する糖鎖を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【請求項56】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に脂肪酸もしくは脂肪酸エステルを固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【請求項57】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面にリガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドを固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【請求項58】 前記プラズマ重合膜のモノマー原料からなるプラズマ重合膜において、請求項17~31のい



ずれかのモノマー原料によりプラズマ処理を施すことを特徴とする、請求項 1～14 のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【請求項 59】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された免疫性蛋白質又は酵素とからなる層が光学部分に設けられている表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルのプラズマ重合膜において、請求項 17～31 のいずれかに記載されたモノマー原料によりプラズマ処理

することを中心とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は表面プラズモン共鳴バイオセンサー及びそれに用いる測定セル、ならびにその測定セルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 現在、臨床検査等で免疫反応を利用した測定が数多く行われているが、従来法では煩雑な操作や標識物質を必要とするため、標識物質を必要とすることなく、リガンドの変化を高感度に検出することのできる表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した免疫センサーが使用されている。この表面プラズモン共鳴の現象は、ガラス等の光学的に透明な物質と金属薄膜層との境界から反射された単色光の強度が、金属の射出側にある試料の屈折率に依存することによるものであり、従って、反射された単色光の強度を測定することにより、試料を分析することができる。

【0003】 この表面プラズモン共鳴を利用した測定装置 (表面プラズモン共鳴バイオセンサー) で一般的に使用される測定セルの光学部分は、図 2 に示すような構造を有する。即ち、ガラス基板 1 上に成膜された金属薄膜 2 の上に、多孔質材料 5 が形成されており、この多孔質材料 5 の表面及び内部に酵素、抗体等の生理活性物質 4 が担持又は固定されている。この多孔質材料 5 としては、例えば合成繊維、天然繊維、無機繊維等からなる織物、編物、不織布や、多孔性の無機又は有機材料などが使用される (特開平 3-164195 号公報参照)。また、市販品 (BIAcore 2000 用、ファルマシアバイオセンサー社製) では、この多孔質材料 5 としてカルボキシメチルデキストランが用いられている。

【0004】 しかしながら、測定対象物と実質的に相互作用する生理活性物質 4 というのは、多孔質材料 5 の表面に存在するものだけであるため、多孔質材料 5 の内部に担持又は固定されている生理活性物質 4 は条件によっては拡散律速となり、その分反応効率が低下することとなる。また、生理活性物質 4 を金属薄膜 2 に固定する方法として、LB (Langmuir-Blodgett) 法が用いられる場合もあるが (特開平 5-288672 号公報参照)、LB 膜と

金属薄膜との結合が弱く、生理活性物質と共に脱落するという問題がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、固定化する生理活性物質が少量であっても、良好な感度が得られる表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルを提供すること、ならびにその測定セルの製造方法及びその測定セルを使用した表面プラズモン共鳴バイオセンサーを提供することである。

【0006】

【課題を解決する手段】 上記課題に鑑み鋭意研究の結果、本発明者等は、プラズマ重合膜を介して生理活性物質を固定化すれば、使用する生理活性物質が少量であっても良好な感度が得られることを見出し、本発明を完成した。本発明は、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された生理活性物質とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルである。

【0007】 また、本発明は、上記表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルを使用した表面プラズモン共鳴バイオセンサーである。さらに、本発明は、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に生理活性物質を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法である。

【0008】 即ち、本発明は

(1) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成された少なくとも 1 層以上のプラズマ重合膜とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(2) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された核酸とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0009】 (3) 前記核酸が DNA、RNA 又は PNA のいずれかであることを特徴とする、請求項 2 記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(4) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された非免疫性蛋白質とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0010】 (5) 前記非免疫性蛋白質が、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン又はレセプターのいずれかであることを特徴とする、(4) 記載の表面プラズモン

共鳴バイオセンサー用測定セル。

(6) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された免疫グロブリン結合性タンパク質とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0011】(7) 前記免疫グロブリン結合性タンパク質がプロテインA、プロテインG又はリウマチ因子のいずれかであることを特徴とする、(6)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(8) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された糖結合性タンパク質とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0012】(9) 前記糖結合性タンパク質がレクチンであることを特徴とする、(8)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(10) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された糖を認識する糖鎖とからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0013】(11) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された脂肪酸もしくは脂肪酸エステルとからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(12) 前記脂肪酸もしくは脂肪酸エステルがステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、ステアリン酸エチル、アラキジン酸エチルまたはベヘン酸エチルのいずれかであ



で表される化合物及び/又は、下記の式(2)



で表される化合物であることを特徴とする、(17)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0020】(19) 前記窒素を含む化合物が、ピリジン、エチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン、*n*-プロピルアミン、モノエチルアミン、トリエチルアミン、ジエチルアミン、アリルアミン、アクリルアミド、アニリン、アクリロニトリル、1,2,4-トリアゾール、5-アミノ-1H-テトラゾール、プロパルギルアミン又はアセトニトリルのいずれかであることを特徴とする、(17)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0021】(20) 前記プラズマ重合膜のモノマー原料

ることを特徴とする、(11)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

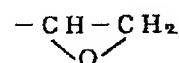
【0014】(13) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定されたリガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドとからなる層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(14) 前記ポリペプチドもしくはオリゴペプチドが、遺伝子工学的的手法あるいは化学合成法を用いて作製されたことを特徴とする、(13)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0015】(15) 前記プラズマ重合膜が-COOH基、-CHO基、-SH基、-NH<sub>2</sub>基、-OH基、=NH基、-CONH<sub>2</sub>基、-NCO基、-CH=CH<sub>2</sub>基、=C=O基又は

【0016】

【化3】

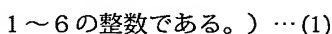


【0017】のいずれか1又は2以上を含むことを特徴とする、(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0018】(16) 前記プラズマ重合膜が2層以上の多層構造をなすことを特徴とする(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(17) 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、窒素を含む化合物であることを特徴とする、(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0019】(18) 前記窒素を含む化合物が、下記の式(1)



が、硫黄を含む化合物であることを特徴とする、(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

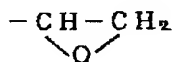
(21) 前記硫黄を含む化合物が、硫化ジメチル、二硫化メチル、エタンチオール、エタンジチオール、チオフェン、メルカプトエタノール又はジスレイトールのいずれかであることを特徴とする、(20)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(22) 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、ハロゲンを含む化合物であることを特徴とする、(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0022】(23) 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、-COOH基、-CHO基、-SH基、-NH<sub>2</sub>基、-OH基、=NH基、-CONH<sub>2</sub>基、-NCO基、-CH=CH<sub>2</sub>基、=C=O基又は

【0023】

【化4】



【0024】のいずれか1又は2以上を同一分子内に含むことを特徴とする、(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0025】(24) 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が-OH基を含むものであって、この-OH基がプロパルギルアルコールであることを特徴とする、(23)に記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(25) 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、C及びHからなる炭化水素化合物であることを特徴とする、

(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0026】(26) 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、有機金属化合物であることを特徴とする、(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(27) 前記有機金属化合物が有機ケイ素化合物であることを特徴とする、(26)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0027】(28) 前記有機ケイ素化合物がテトラメチルシラン、テトラメチルジシロキサン、ヘキサメチルジシロキサン、ヘキサメチルジシラザン、ヘキサメチルシクロトリシラザン、ジエチルアミノトリメチルシラン、トリメチルビニルシラン、テトラメトキシシラン、アミノプロピルトリエトキシシラン、オクタデシルジエトキシメチルシラン、ヘキサメチルジシラン又はジビニルテトラメチルジシロキサンのいずれかであることを特徴とする、(27)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0028】(29) 前記プラズマ重合膜に、重合性あるいは非重合性モノマー原料によりプラズマ処理を施すことを特徴とする、(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(30) 前記非重合性モノマー原料が窒素、アンモニア、ヒドラジン、硫化水素、二硫化水素、酸素、水素、水、ハロゲンガス又は希ガスのいずれかであることを特徴とする、(29)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0029】(31) 前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、(17)～(30)記載のものの2種以上混合したものであることを特徴とする、(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(32) 前記プラズマ重合膜の表面に固定するものが免疫性蛋白質又は酵素であり、前記プラズマ重合膜のモノマー原料がピリジン、トリエチルアミン、ジエチルアミン、アリルアミン、アクリルアミド、アニリン、アクリロニトリル、1,2,4-トリアゾール、5-アミノ-1H-テトラゾール又はアセトニトリルのいずれかであることを特徴とする、(1)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0030】(33) 前記プラズマ重合膜の表面に固定するものが免疫性蛋白質又は酵素であり、前記プラズマ重合膜のモノマー原料が、(20)～(31)項記載のいずれかに記載されたものであることを特徴とする、

(1)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(34) 前記免疫性蛋白質が抗体であることを特徴とする(32)または(33)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0031】(35) 前記抗体のFabフラグメントがプラズマ重合膜の表面に固定されていることを特徴とする

(34)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(36) 前記抗体のF(ab)<sub>2</sub>フラグメントがプラズマ重合膜の表面に固定されていることを特徴とする(35)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(37) 前記プラズマ重合膜と前記核酸との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、(2)又は(3)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0032】(38) 前記プラズマ重合膜と前記非免疫蛋白質との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、(4)又は(5)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(39) 前記プラズマ重合膜と前記免疫グロブリン結合性蛋白質との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、

(6)又は(7)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0033】(40) 前記プラズマ重合膜と前記糖結合性蛋白質との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、

(8)又は(9)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(41) 前記プラズマ重合膜と前記糖を認識する糖鎖との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、(10)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0034】(42) 前記プラズマ重合膜と前記脂肪酸もしくは脂肪酸エステルとの間に、さらに架橋試薬ある

は縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、(11)または(12)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(43) 前記プラズマ重合膜と前記リガンド結合能を有するポリペプチドあるいはオリゴペプチドとの間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した層が設けられていることを特徴とする、(13)又は(14)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0035】(44) 前記架橋試薬が、グルタルアルデヒド、過ヨウ素酸、N-スクシニミジル-2-マレイミド酢酸、N-スクシニミジル-4-マレイミド酪酸、N-スクシニミジル-6-マレイミドヘキサ酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドメチルシクロヘキサン-1-カルボン酸、N-スルホスクシニミジル-4-マレイミドメチルシクロヘキサン-1-カルボン酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドメチル安息香酸、N-スクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-スルホスクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドフェニル-4-酪酸、N-スルホスクシニミジル-4-マレイミドフェニル-4-酪酸、NN-*o*-オキシジメチレン-ジマレイミド、NN-*o*-フェニレン-ジマレイミド、NN-*m*-フェニレン-ジマレイミド、NN-*p*-フェニレン-ジマレイミド、NN-ヘキサメチレン-ジマレイミド、N-スクシニミジルマレイミドカルボン酸、N-スクシニミジル-S-アセチルメルカプト酢酸、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、S-アセチルメルカプトスクシニックアンヒドライド、メチル-3-(4-ジチオピリジル)プロピオニミデート、メチル-4-メルカプトブチルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオニミデート、イミノチオレン、*o*-カルボキシメチル-ヒドロキシルアミン、アゾジフェニルビルマレイミド、ビス(スルホサクシニイミジル)スベレイト、4,4-ジイソチオシアノ-2,2-ジスルホン酸スチルベン、4,4-ジフルオロ-3,3-ジニトロジフェニルスルホン、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン、*p*-フェニレンジイソチオシアネイト、ジメチルアジピミデート、ジメチルピメルイミデート、ジメチルスベリイミデート、*p*-アジドフェナシルプロマイド、*p*-アジドフェニルグリオキサル、N-ヒドロキシサクシニイミジル-4-アジドベンゾエイト、4-フルオロ-3-ニトロフェニルアジド、メチル-4-アジドベンゾイミデート、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシイミド、N-スクシイミジル6-

(4-アジド-2-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエイト、1,4-ベンゾキノ、N-スクシニイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、N-(4-マレイミドブチロキシ)スルホスクシンイミドナトリウム塩、N-(6-マレイミドカプロイロキシ)スルホスクシンイミドナトリウム塩、N-(8-マレイミド

カプロイロキシ)スルホスクシンイミドナトリウム塩、N-(11-マレイミドウンデカノイロキシ)スルホスクシンイミドナトリウム塩、N-[2-(1-ピペラジニル)エチル]マレイミド二塩酸、ビスジアゾベンジン、ヘキサメチレンジイソシアネート、トルエンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N-エチレンビスマレイニイミド、N,N-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、2,4-ジニトロベンゼンスルフォネートナトリウム塩、ジアゾ化合物あるいは縮合試薬が $RN=C=NR$ (又は $R$ )で表されるカルボジイミド誘導体、N-ヒドロキシスクシイミド、トリ-*n*-ブチルアミン、ブチルクロロフォルメート、イソブチルイソシアニドからなる群から選ばれた少なくとも1または2以上であることを特徴とする、(37)~(43)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0036】(45) 前記プラズマ重合膜と前記免疫性蛋白質又は酵素との間に、さらに架橋試薬あるいは縮合試薬水溶性により形成した層が設けられていることを特徴とする、(32)~(36)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0037】(46) 前記架橋試薬が、N-スクシニミジル-4-マレイミドメチル安息香酸、N-スクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドフェニル-4-酪酸、NN-*o*-オキシジメチレン-ジマレイミド、NN-*m*-フェニレン-ジマレイミド、NN-*p*-フェニレン-ジマレイミド、NN-ヘキサメチレン-ジマレイミド、N-スクシニミジルマレイミドカルボン酸、N-スクシニミジル-S-アセチルメルカプト酢酸、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、S-アセチルメルカプトスクシニックアンヒドライド、メチル-3-(4-ジチオピリジル)プロピオニミデート、メチル-4-メルカプトブチルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオニミデート、イミノチオレン、*o*-カルボキシメチル-ヒドロキシルアミン、アゾジフェニルビルマレイミド、ビス(スルホサクシニイミジル)スベレイト、4,4-ジイソチオシアノ-2,2-ジスルホン酸スチルベン、4,4-ジフルオロ-3,3-ジニトロジフェニルスルホン、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン、*p*-フェニレンジイソチオシアネイト、ジメチルアジピミデート、ジメチルピメルイミデート、ジメチルスベリイミデート、*p*-アジドフェナシルプロマイド、*p*-アジドフェニルグリオキサル、N-ヒドロキシサクシニイミジル-4-アジドベンゾエイト、4-フルオロ-3-ニトロフェニルアジド、メチル-4-アジドベンゾイミデート、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシイミド、N-スクシイミジル6-

(4-アジド-2-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエイト、1,4-ベンゾキノ、N-スクシニイミジル-

3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、ビスジアゾベンジジン、ヘキサメチレンジイソシアネート、トルエンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N、N-エチレンビスマレインイミド、N、N-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、ジアゾ化合物あるいは縮合試薬が $RN=C=NR$ （又は $R$ ）で表されるカルボジイミド誘導体、N-ヒドロキシスクシイミド、トリ-n-ブチルアミン、ブチルクロロフォルメーテ、イソブチルイソシアニドからなる群から選ばれた少なくとも1または2以上であることを特徴とする、

(45) 記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0038】(47) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定される物質と、さらにその上にプラズマ重合膜あるいはプラズマ処理を施した層が光学部分に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(48) 前記固定される物質が請求項2～13又は32に記載されたものであることを特徴とする(47)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0039】(49) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成された少なくとも1層以上のプラズマ重合膜とからなる層が光学部分に設けられており、該プラズマ重合膜に疎水結合により物質が固定されていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

(50) 前記固定された物質が(2)～(13)又は(32)に記載されたものであることを特徴とする(49)記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル。

【0040】(51) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に核酸を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

(52) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に非免疫蛋白質を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【0041】(53) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に免疫グロブリン結合性蛋白質を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

(54) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に糖結合性蛋白質を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【0042】(55) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に糖を認識する糖鎖を固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

(56) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面に脂肪酸もしくは脂肪酸エステルを固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【0043】(57) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルの製造方法において、光学的に透明な基板上に金属膜を形成した後、該金属膜の上にプラズマ重合膜を形成し、次いで該プラズマ重合膜の表面にリガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドを固定化することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

(58) 前記プラズマ重合膜のモノマー原料からなるプラズマ重合膜において、(17)～(31)のいずれかのモノマー原料によりプラズマ処理を施すことを特徴とする、(1)～(14)のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法。

【0044】(59) 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定セルにおいて、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜と、該プラズマ重合膜の表面に固定された免疫性蛋白質又は酵素とからなる層が光学部分に設けられている表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルのプラズマ重合膜において、(17)～(31)のいずれかに記載されたモノマー原料によりプラズマ処理することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの製造方法に関する。

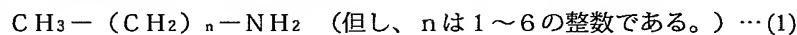
【0045】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の一例による表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの光学部分の断面概略図を図1に示す。ここで、本明細書における測定セルの「光学部分」とは、光が照射され、エバネッセント波と表面プラズモンが生じ得る部分をいうものとする。

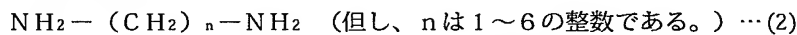
【0046】本実施例による表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セル（以下、「測定セル」と略す場合がある。）の光学部分は、光学的に透明な基板（透明基板）1と、透明基板1の上に形成された金属薄膜2と、

金属薄膜2の上に形成されたプラズマ重合膜3と、プラズマ重合膜3の表面に固定された生理活性物質4とを有する。透明基板1としては、通常表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルに使用されるものであればよく、一般的にはガラスや、レーザー光に対して透明な材料からなるものであり、その厚さは0.1～5mm程度である。

【0047】金属薄膜2としては、表面プラズモン共鳴が生じ得るようなものであれば特に限定されない。この金属薄膜2に使用することのできる金属の種類として



で表される化合物や、下記の式(2)



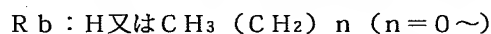
で表される化合物、あるいはアセトニトリル、ビニルアミン、ピリジンなどの炭素(C)、水素(H)及び窒素(N)からなり2重結合又は3重結合を含む化合物等を用いることができる。

【0049】また、後述する架橋試薬あるいは縮合試薬により形成される層を設ける場合には、さらに硫黄(S)、酸素(O)又は珪素(Si)を含有する化合物を使用することもできる。一般的には、炭素(C)、水素(H)、窒素(N)、硫黄(S)、酸素(O)及び珪素(Si)から選ばれる任意の元素を2種以上適宜含む化合物を使用することができる。この他にも、ハロゲンガスあるいは稀ガスも有効である。

【0050】窒素を含む化合物としては、窒素N<sub>2</sub>、アンモニア、ヒドラジン、ピリジンの他に上記一般式に含

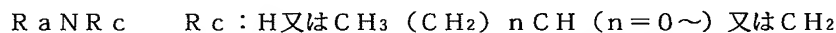


及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを含む。



及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを含む。

【0052】

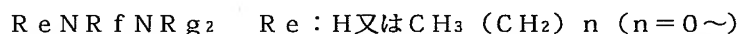


及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを含む。

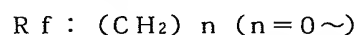


及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを含む。

【0053】



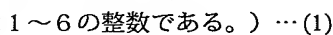
及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを含む。



及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の

層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。金属薄膜2の膜厚は、100～2000Åであるのが好ましく、特に100～500Åであるのが好ましい。3000Åを超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、30～50Åであるのが好ましい。

【0048】プラズマ重合膜3は、モノマー原料をプラズマ重合することにより三次元架橋してなる膜である。本発明で使用することのできるモノマー原料としては、プラズマ重合することにより生理活性物質を固定化できるものであれば、いかなるものであってもよいが、例えば、下記の式(1)



で表される化合物や、下記の式(2)で表される化合物、あるいはアセトニトリル、ビニルアミン、ピリジンなどの炭素(C)、水素(H)及び窒素(N)からなり2重結合又は3重結合を含む化合物等を用いることができる。

【0049】また、後述する架橋試薬あるいは縮合試薬により形成される層を設ける場合には、さらに硫黄(S)、酸素(O)又は珪素(Si)を含有する化合物を使用することもできる。一般的には、炭素(C)、水素(H)、窒素(N)、硫黄(S)、酸素(O)及び珪素(Si)から選ばれる任意の元素を2種以上適宜含む化合物を使用することができる。この他にも、ハロゲンガスあるいは稀ガスも有効である。

【0050】窒素を含む化合物としては、窒素N<sub>2</sub>、アンモニア、ヒドラジン、ピリジンの他に上記一般式に含

【0051】更に、

【0051】更に、

結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを  
含む。

R g : H又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$  ( $n=0\sim$ )

及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の  
結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを  
含む。

【0054】

R h N R i N R j

R h : H又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$  ( $n=0\sim$ )

又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}$  ( $n=0\sim$ ) 又は  
 $\text{CH}_2$

及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の  
結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを  
含む。

R i :  $(\text{CH}_2)_n$  ( $n=0\sim$ ) 又は $\text{CH}(\text{CH}_2)_n$   
 $\text{CH}$  ( $n=0\sim$ )

及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の  
結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを  
含む。

R j : H又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}$  ( $n=0\sim$ )

又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}$  ( $n=0\sim$ ) 又は  
 $\text{CH}_2$ 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{C}$  ( $n=0\sim$ ) 又は  
 $\text{CH}$

及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の  
結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを  
含む。

【0055】

N R k N :

R k :  $\text{C}(\text{CH}_2)_n\text{C}$  ( $n=0\sim$ )

及び鎖中に2重結合又は3重結合あるいは両方の  
結合を持つもの、さらに分岐又は環化したものを  
含む。

も含まれる。

【0056】硫黄を含む化合物としては、硫化水素、二  
硫化炭素、チオフェンの他に一般式 $\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_n$   
 $\text{CH}_3$  ( $n=0\sim$ ) で表される化合物、例えば硫化ジメ  
チル $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ や一般式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SS}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$  ( $n=0\sim$ ,  $m=0\sim$ ) の一般式で表される  
化合物、例えば二硫化メチル $\text{CH}_3\text{SSCH}_3$ 、あるいは  
一般式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SH}$  ( $n=0\sim$ ) の化合物で例  
えばエタンチオール $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$ 、一般式 $\text{SH}(\text{CH}_2)_n\text{SH}$  ( $n=1\sim$ ) の化合物で例えばエタンジチオ  
ール $\text{SH}(\text{CH}_2)_2\text{SH}$ 等が挙げられる。

【0057】稀ガスとしては、アルゴン、ネオン、ヘリ  
ウム、クリプトン及びキセノンが挙げられる。更に、-

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$  (但し、 $n$ は1～6の整数である。) …(1)

で表される化合物又は下記の式(2)

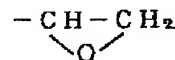
$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$  (但し、 $n$ は1～6の整数である。) …(2)

で表される化合物は、2重結合又は3重結合を有する化  
合物よりも成膜速度が遅く、均質な膜が得られるため好  
ましい。プラズマ重合膜3の膜厚は、100～3000Åであ  
るのが好ましく、特に500～1000Åであるのが好まし

$\text{COOH}$ 基、 $-\text{CHO}$ 基、 $-\text{SH}$ 基、 $-\text{NH}_2$ 基、 $-\text{OH}$   
基、 $=\text{NH}$ 基、 $-\text{CONH}_2$ 基、 $-\text{NCO}$ 基、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 基、 $=\text{C}=\text{O}$ 基又は

【0058】

【化5】



【0059】のいずれか1又は2以上を同一分子内に含  
む化合物も用いることができるが、例えばシステイン、  
グルタチオン、ホルミルコハク酸、アミノ安息香酸、ア  
ミノヘキサン酸、メルカプト安息香酸等が挙げられる。

【0060】以上の各化合物の中でも、2重結合及び3  
重結合を有しない下記の式(1)

い。

【0061】また、プラズマ重合膜は、各種モノマー原  
料を混合してプラズマ重合させることにより、つくるこ  
ともできるし、積層してつくることも可能である。更に



は、積層と混合とを併用することも可能である。本発明におけるプラズマ重合膜3は、以下のような利点を有する。

【0062】①ピンホールフリーの非晶質で緻密な膜である。

②膜厚500Å程度から均質な成膜が可能であり、屈折率の変動が極めて少ない。

③プラズマガスの種類を変えることにより、膜厚だけでなく、官能基導入などの表面修飾や表面改質が可能であるばかりでなく、導入する官能基の密度を調節することも可能である。

④成膜条件はドライプロセスであるため、半導体技術との併合が可能である。

⑤耐薬品性、耐熱性、機械的性質に優れており、安定である。

【0063】また、SPR用センサーチップの場合、金属薄膜が必須であるため、この金属薄膜とプラズマ重合膜を同一チャンバー内で作製することが可能であるため、製造プロセスの簡略化を図ることもできる。このプラズマ重合膜を、更に非重合性あるいは重合性モノマーのプラズマに暴露してプラズマ処理を施すことにより、官能基導入などの表面改質を行うことも有効である。一般には非重合性モノマーあるいは不活性モノマーでの処理をプラズマ処理と定義することも多いが、ここでは重合性モノマーでの処理もプラズマ処理の範疇に含めることとする。

【0064】生理活性物質4としては、測定対象物と相互作用するものであれば特に限定されず、核酸や、非免疫蛋白質例えばアビジン（ストレプトアビジン）、ビオチン又はレセプター、免疫グロブリン結合性蛋白質、糖結合性蛋白質、糖を認識する糖鎖、脂肪酸あるいは脂肪酸エステル、リガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドあるいは免疫性蛋白質等が挙げられる。核酸としては、DNA、RNA、PNA（Peptide Nucleic acid）を使用することができる。また、免疫グロブリン結合性蛋白質としては、例えばプロテインAあるいはプロテインG、リウマチ因子（RF）等を使用することができる。糖結合性蛋白質としては、レクチン等が挙げられ、免疫性蛋白質としては、抗体が挙げられる。

【0065】脂肪酸あるいは脂肪酸エステルとしては、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、ステアリン酸エチル、アラキジン酸エチル、ベヘン酸エチル等が挙げられる。プラズマ重合膜のモノマー原料であるハロゲンを含む化合物としては、テトラフルオロエチレン、クロロベンゼン、ヘキサクロロベンゼン、ヘキサフルオロベンゼン又はフッ化ビニル等が含まれる。

【0066】同じくプラズマ重合膜のモノマー原料である有機ケイ素化合物としては、テトラメチルシラン、テトラメチルジシロキサン、ヘキサメチルジシロキサン、

ヘキサメチルジシラザン、ヘキサメチルシクロトリシラザン、ジエチルアミノトリメチルシラン、トリメチルビニルシラン、テトラメトキシシラン、アミノプロピトリエトキシシラン、オクタデシルジエトキシメチルシラン、ヘキサメチルジシラン又はジビニルテトラメチルジシロキサン等が挙げられる。

【0067】生理活性物質として抗体を用いた場合、通常は図1に示されるように抗体のFcフラグメントがプラズマ重合膜3の表面のみに固定され、抗体は単分子層状態に形成される。但し、抗体のFabフラグメントがプラズマ重合膜3から離れる程、感度や反応速度が低下するため、図3に示すようにFabフラグメント（図3（a））又はFab'（図3（b））を直接プラズマ重合膜3に固定化して、感度や反応速度を向上させても良い。生理活性物質4の厚さは、使用する生理活性物質自体の大きさにもよるが、100～3000Åであるのが好ましく、特に100～1000Åであるのが好ましい。

【0068】本発明の他の一例による表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの概略図を図4に示す。本実施例による表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルは、上記測定セルとほぼ同様の構成を有するが、プラズマ重合膜3の上にさらに架橋試薬あるいは縮合試薬により形成した膜（これを「共有結合膜」という。）6が設けられており、生理活性物質4がこの共有結合膜6を介してプラズマ重合膜3に固定されている。

【0069】共有結合膜6を形成する架橋試薬あるいは縮合試薬は、生理活性物質4を共有結合的に強固に固定化できるものであれば、特に限定されない。そのような架橋試薬あるいは縮合試薬としては、例えばグルタルアルデヒド、過ヨウ素酸、N,N-0-フェニレンジマレイミド、N-スクシニミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシニミジルマレイミド酢酸、N-スクシニミジル-4-マレイミド酢酸、N-スクシニミジル-6-マレイミドヘキサン酸、N-スルホスクシニミジル-4-マレイミドメチルシクロヘキサン-1-カルボン酸、N-スルホスクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-（4-マレイミドブチロキシ）スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-（6-マレイミドカプロイロキシ）スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-（8-マレイミドカプリロキシ）スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-（11-マレイミドウンデカノイロキシ）スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N[2-（1-ピペラジニル）エチル]マレイミド・二塩酸等が挙げられ、それぞれ単独で又は組み合わせて使用することができる。これらの中でも、汎用性が高く、取扱いの容易なグルタルアルデヒドが好ましい。

【0070】このような共有結合膜6を設け、生理活性物質4を共有結合で強固に固定化することにより、当該



測定セルを洗浄しても生理活性物質4の固定化を維持できるため、繰り返し測定に使用することができるという利点が得られる。共有結合膜6の厚さは、10~100 Åであるのが好ましく、特に10~20 Åであるのが好ましい。しかし、プラズマ重合膜の膜質や固定化手法によっては必ずしも共有結合膜を介する必要はなく、疎水的に結合させる、あるいはプラズマ重合膜やプラズマ処理によって物質を包括することにより固定化させても良い。

【0071】本発明の測定セルの光学部分における層は、以下のようにして形成することができる。まず、透明基板1上に金属薄膜2を形成する。金属薄膜2の形成は常法によって行えばよく、例えばスパッタリング、CVD、PVD、真空蒸着法等によって行うことができる。

【0072】次に、金属薄膜2の上にプラズマ重合膜3を形成する。プラズマ重合膜3の形成は、前述したモノマーを原料としてプラズマ重合によって行えばよく、通常のプラズマ重合装置を使用することができる。プラズマ重合の条件としては、成膜速度が100~3000 Å/min、特に500~1000 Å/minとなるように設定するのが好ましい。3000 Å/minを超えると、均質なプラズマ重合膜が得られにくくなる。具体的には、モノマー原料の流量を0.05~100 sccmとし、温度を室温又は10~20℃とし、圧力を $1.0 \times 10^{-2}$ ~ $1.0 \times 10^2$  Paとし、放電電力を20~300 Wとし、放電周波数を10 MHz 又は13.56 MHzとするのが好ましいが、条件はこれらに限定されるものではない。

【0073】プラズマ重合膜3を形成したら、最後にプラズマ重合膜3に生理活性物質4を固定化する。固定化方法は常法によって行えばよく、例えば、所定量の生理活性物質4をプラズマ重合膜3に所定時間接触させることにより固定化することができる。測定セルがフローセル型であれば、一定流量の生理活性物質4を所定時間(所定量)流してプラズマ重合膜3に接触させればよい。

【0074】生理活性物質として抗体を用いた場合であって、抗体のFabフラグメントを直接プラズマ重合膜3に固定化する場合には、パパインを用いて抗体を部分分解した後、同様の処理を行えばよい。一方、抗体のFab'(a b')<sub>2</sub>フラグメントを直接プラズマ重合膜3に固定化する場合には、ペプシンを用いて抗体を部分分解した後、同様の処理を行えばよい。また、共有結合膜6を設ける場合には、生理活性物質4と同様の方法によって架橋試薬あるいは縮合試薬をプラズマ重合膜3に接触させ、続いて生理活性物質4を固定化すればよい。

【0075】本発明の表面プラズモン共鳴バイオセンサーは、以上説明したような本発明の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルを使用してなるものである。本発明の一実施例による表面プラズモン共鳴バイオセンサーの概念図を図5に示す。本表面プラズモン共鳴バイ

オセンサーは、カートリッジブロック7と、光源8と、検出器9とを有し、カートリッジブロック7の上に測定チップ10を設置してなる。カートリッジブロック7の上には凹部が設けられており、この凹部と上記測定チップ10とで測定セル71が構成される。

【0076】測定チップ10の本体は透明基板からなり、その光学部分(カートリッジブロック7の凹部に対応する部分)における裏面には、金属薄膜と、その下に形成されたプラズマ重合膜と、その表面に固定された生理活性物質とからなる層が設けられている(図示せず)。本実施例によるセンサーでは、測定セル71はカートリッジブロック7の凹部と測定チップ10とで構成されており、またカートリッジブロック7には測定セル71及びカートリッジブロック7の外部に連通した流路72、73が設けられ、測定セル71はフローセル型となっているが、本発明はこれに限定されることなく、バッチ型セルからなる構造のものであってもよい。このように測定セル71をフローセル型とすることにより、試料を連続的又は断続的に測定することができる。本センサーでは、試料は流路72を通じて測定セル71中に流れ込み、測定に供された後流路73を通じて外部に排出される。試料の流速は、0.5~5 µl/分であるのが好ましい。流速の調節は、例えばコンピュータの指令により作動するポンプを使用すればよい。

【0077】光源8からは、測定チップ10の光学部分に向かって単色光が照射され(入射光80)、測定チップ10の裏面に設けられた金属薄膜で反射したその反射光90が、検出器9に入光する。検出器9では、反射光90の強度を検出することができる。光源8及び検出器9は、通常表面プラズモン共鳴バイオセンサーに使用されるものであれば、いかなるものであってもよい。本発明のセンサーでは、くさび型の光を入射させ、いろいろな方向への反射光を一度に測定することができるようになっているが、本発明はこれには限定されない。このような構造にすれば可動部分を設ける必要がないため、安定性及び耐久性に優れたものとなり、またリアルタイムで試料を測定することができる。

【0078】上記のような構造によって、ある入射角θに対して谷を形成する反射光強度曲線が得られる(図6参照)。反射光強度曲線における谷は、表面プラズモン共鳴によるものである。即ち、光が測定チップ10の透明基板と外との界面で全反射するとき、その界面にエバネッセント波といわれる表面波が生じ、一方、金属薄膜にも表面プラズモンといわれる表面波が生じる。この2つの表面波の波数が一致すると共鳴が起こり、光のエネルギーの一部が表面プラズモンを励起するために使用され、反射光の強度が低下する。ここで、表面プラズモンの波数は、金属薄膜表面のごく近くにある媒質の屈折率の影響を受けるため、測定対象物質と生理活性物質との相互作用により媒質の屈折率が変化すると、表面プラズ

モン共鳴が生じる入射角  $\theta$  が変化する。従って、反射光強度曲線の谷のずれによって、測定対象物質の濃度の変化を検知することができる。入射角  $\theta$  の変化量は共鳴シグナルといわれ、 $10^{-4}^{\circ}$  の変化を 1 RU として表す。

【0079】本実施例の表面プラズモン共鳴バイオセンサーにおいて、測定チップ10を脱着自在の使い捨て型のものにすれば、効率良く、信頼度の高い測定を行うことができる。また、プラズマ重合膜と生理活性物質との間に共有結合膜を設ければ、測定セル71内を洗浄することにより測定チップ10を繰り返し使用することができ、コストの低下を図ることができる。本発明の表面プラズモン共鳴バイオセンサーは、試料中における目的物質の定量、定性及び同定などに使用することができる。以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0080】（実施例1）本実施例では、図1に示されるような層を光学部分に有する測定チップを作製した。透明基板としては、厚さ0.15mmのガラス板（18mm×18mm）を使用した。この透明基板上に、スパッタリングによりクロムからなる層、次いで金からなる層を形成した。スパッタリングの条件としては、クロムの場合で100 W、40秒間であり、金の場合で100 W、2分30秒間であった。得られたクロム層の厚さは40Åであり、金層の厚さは500 Åであった。

相補鎖DNAの濃度 ( $\mu$  M) 0.00075  
RU

成膜サンプルをXPS分析したところメルカプト基の存在が確認された。ここで、プラズマ重合膜形成前及び形成後における反射光強度曲線（入射角  $\theta$  に対応した反射光の強度を表す曲線）を図6に示す。図6の反射光強度曲線より、金表面上にプラズマ重合膜が形成されたことを確認することができる。また、 $\Delta\theta$  よりプラズマ重合膜の膜厚を見積もることができる。

【0084】（実施例2）実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜のモノマー原料としては、アセトニトリルを使用した。プラズマ重合の条件は、

モノマー原料の流量：1.5sccm+Ar希釈15（sccm）  
温度：室温  
圧力：1.6Pa  
放電電力：80W

相補鎖DNAの濃度 ( $\mu$  M) 0.00075  
RU

成膜サンプルをXPS分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0087】（実施例3）実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、実施例2と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路か

【0081】次に、金属の上にプラズマ重合膜を成膜した。プラズマ重合には、図7に示されるような装置を用いた。チオール基導入のため、プラズマ重合膜のモノマー原料としては、エタンジチオールを使用した。プラズマ重合の条件は、

モノマー原料の流量：15sccm  
温度：15℃  
圧力：4.7Pa  
放電電力：20W  
放電周波数：10MHz、FM変調  
放電時間：60sec

【0082】上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行い、表面にチオール基を導入した。チオール導入されたセンサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路からマレイミド化アビジン（調製法；「超高感度酵素免疫測定法」石川栄治著参照）を流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で測定セルに流し込み、60分間かけてプラズマ重合膜上のチオール基に固定させた。さらに $10\mu\text{M}$ ビオチン化DNAを $50\mu\text{l}$ 流し、10分間かけてアビジンを介してプローブDNAを固定させた。このプローブDNAに相補的な塩基配列を持つDNA  $7.5\times 10^{-7}\text{M}$ を流して反応させたところ、約500RUのシグナルが得られた。

【0083】

0.0075 0.075 0.75 7.5 75  
25 100 500 1000 1100

放電周波数：13.56MHz  
放電時間：15sec

【0085】上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路から5%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、アビジン（濃度 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ）も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。さらに $10\mu\text{M}$ ビオチン標識プローブRNAを流速 $1\mu\text{l}/\text{min}$ で流し、10分間かけてプローブRNAを固定させた。このプローブRNAに相補的な塩基配列を持つDNA  $7.5\times 10^{-7}\text{M}$ を流して反応させたところ、約400RUのシグナルが得られた。

【0086】

0.0075 0.075 0.75 7.5 75  
20 80 400 800 880

ら5%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、ストレプトアビジン（濃度 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ）も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。さらに $10\mu\text{M}$ ビオチン標識プローブRNAを流速 $1\mu\text{l}/\text{min}$ で流し、10分間かけてプローブRNAを固定させた。このプローブRNAに相補的な塩基配列を持つDNA  $7.5\times 10^{-7}\text{M}$ を流して反応させた

ところ、約375RUのシグナルが得られた。

相補鎖DNAの濃度 ( $\mu\text{M}$ )	0.00075	0.0075	0.075	0.75	7.5	75
RU	7.5	18.75	75	375	750	825

成膜サンプルをXPS分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0089】(実施例4) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、モノマー原料としてプロパルギルアミンを用いた以外は、実施例2と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイ

相補鎖DNAの濃度 ( $\mu\text{M}$ )	0.00075	0.0075	0.075	0.75	7.5	75
RU	0.9	22.5	90	450	900	990

オセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路から0.4M N-エチル-N-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジミドを流

【0091】(実施例5) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、実施例4と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイ

HSA抗原濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	5	12.5	50	250	500	550

成膜サンプルをXPS分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0093】(実施例6) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、実施例4と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイ

BSA抗原濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	4.5	11.25	45	225	450	495

成膜サンプルをXPS分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0095】(実施例7) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、実施例4と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイ

糖濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	4	10	40	200	400	440

成膜サンプルをXPS分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0097】(実施例8) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、モノマー原料としてピリジンを用いた他は、実施例4と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行

# 【0088】

0.0075	0.075	0.75	7.5	75
18.75	75	375	750	825

速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、アビジン(濃度 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。さらに $10\mu\text{M}$ ビオチン標識プローブRNAを流速 $1\mu\text{l}/\text{min}$ で流し、10分間かけてプローブRNAを固定させた。このプローブRNAに相補的な塩基配列を持つDNA $7.5\times 10^{-7}\text{M}$ を流して反応させたところ、約450RUのシグナルが得られた。

# 【0090】

0.0075	0.075	0.75	7.5	75
22.5	90	450	900	990

間測定セルに流し込み、プロテインA(濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。さらに抗HSA抗体(濃度 $400\mu\text{l}/\text{ml}$ )を流速 $1\mu\text{l}/\text{min}$ で流し、10分間かけて固定させた。この抗HSA抗体に相補的なHSA抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約250RUのシグナルが得られた。

# 【0092】

0.1	1	10	100	1000
12.5	50	250	500	550

間測定セルに流し込み、プロテインG(濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。さらに抗BSA抗体(濃度 $400\mu\text{l}/\text{ml}$ )を流速 $1\mu\text{l}/\text{min}$ で流し、10分間かけて固定させた。この抗BSA抗体に相補的なBSA抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約225RUのシグナルが得られた。

# 【0094】

0.1	1	10	100	1000
11.25	45	225	450	495

ら5%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、マンノース結合レクチン(濃度 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。このマンノース結合レクチンに相補的な糖 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約200RUのシグナルが得られた。

# 【0096】

1	10	100	1000
40	200	400	440

のカートリッジブロック上に設置し、流路から5%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、抗BSA抗体(濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。この抗BSA抗体に相補的なBSA抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約187.5RUのシグナルが得られた。

## 【0098】

抗原BSA濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	3.75	9.375	37.5	187.5	375	412.5

成膜サンプルをXPS分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0099】(実施例9) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、モノマー原料としてアクリロニトリルを用いた他は、実施例8と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオ

抗原BSA濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	4	10	40	200	400	440

成膜サンプルをXPS分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0101】(実施例10) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、モノマー原料としてエタノールを用いた他は、実施例9と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセ

抗原BSA濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	4	10	40	200	400	440

成膜サンプルをXPS分析したところメルカプト基の存在が確認された。

【0103】(実施例11) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、モノマー原料としてチオフェンを用いた他は、実施例10と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサ

抗原BSA濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	3.75	9.375	37.5	187.5	375	412.5

成膜サンプルをXPS分析したところメルカプト基の存在が確認された。

【0105】(実施例12) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、モノマー原料としてアセトニトリルを用いた他は、実施例11と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路から5

HSA抗原濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	5	10	50	250	500	550

成膜サンプルをXPS分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0107】(実施例13) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、実施例12と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路から5%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分

HSA抗原濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
-------------------------------------	------	-----	---	----	-----	------

5%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、抗BSA抗体(濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。この抗BSA抗体に相補的なBSA抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約200RUのシグナルが得られた。

## 【0100】

ンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路からマレイミド化抗BSA抗体を流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。この抗BSA抗体に相補的なBSA抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約200RUのシグナルが得られた。

## 【0102】

一のカートリッジブロック上に設置し、流路からマレイミド化抗BSA抗体を流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。この抗BSA抗体に相補的なBSA抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約187.5RUのシグナルが得られた。

## 【0104】

%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、抗HSA抗体(濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。この抗HSA抗体に相補的なHSA抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約250RUのシグナルが得られた。

## 【0106】

間測定セルに流し込み、抗HSA抗体のFabフラグメント(濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。この抗HSA抗体のFabフラグメントに相補的なHSA抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約275RUのシグナルが得られた。

## 【0108】

R U

成膜サンプルをX P S分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0109】(実施例14) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、実施例13と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路から5%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分

H S A 抗原濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

R U

成膜サンプルをX P S分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0111】(実施例15) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、

①モノマー：ヘキサジエン

モノマー原料の流量：1.5sccm+Ar希釈15 (sccm)

温度：室温

圧力：1.6Pa

放電電力：80W

放電周波数：13.56MHz

放電時間：15sec

【0112】②モノマー：エチレンジアミン

モノマー原料の流量：1.5sccm

温度：室温

圧力：1.6Pa

H S A 抗原濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

R U

成膜サンプルをX P S分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0115】(実施例16) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、

①モノマー：ヘキサメチルジシロキサン

モノマー原料の流量：1.5sccm+Ar希釈15 (sccm)

温度：室温

圧力：1.6Pa

放電電力：80W

放電周波数：13.56MHz

放電時間：15sec

【0116】②モノマー：エチレンジアミン

モノマー原料の流量：1.5sccm

温度：室温

圧力：1.6Pa

H S A 抗原濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

R U

成膜サンプルをX P S分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0119】(実施例17) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、モノマー原料としてプロピルアミンを用いた以外は、実施例

5.5 11 55 275 550 605

間測定セルに流し込み、抗H S A抗体のF (a b)<sub>2</sub>フラグメント(濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。この抗H S A抗体のF (a b)<sub>2</sub>フラグメントに相補的なH S A抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約300RUのシグナルが得られた。

【0110】

0.01 0.1 1 10 100 1000

6 12 60 300 600 660

放電電力：80W

放電周波数：13.56MHz

放電時間：5sec

以上の2段階の工程で目的の表面を得る。

【0113】上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路から5%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、抗H S A抗体(濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。この抗H S A抗体に相補的なH S A抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約250RUのシグナルが得られた。

【0114】

0.01 0.1 1 10 100 1000

5 10 50 250 500 550

放電電力：80W

30 放電周波数：13.56MHz

放電時間：5sec

以上の2段階の工程で目的の表面を得る。

【0117】上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路から5%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、抗H S A抗体(濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ )も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。この抗H S A抗体に相補的なH S A抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約225RUのシグナルが得られた。

【0118】

0.01 0.1 1 10 100 1000

4.5 9 45 225 450 495

2と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路から5%グルタルアルデヒドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、アビジン(濃度 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ )も

同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。さらに $10\mu\text{M}$ ビオチン標識プローブRNAを流速 $1\mu\text{l}/\text{min}$ で流し、10分間かけてプローブRNAを固定させた。このプローブRNAに相補的な塩基配列を持

相補鎖DNAの濃度 ( $\mu\text{M}$ )	0.00075	0.0075	0.075	0.75	7.5	75
RU	8	20	80	400	800	880

成膜サンプルをXPS分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0121】(実施例18) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、

①モノマー：プロパルギルアルコール

モノマー原料の流量： $1.5\text{sccm}$

温度：室温

圧力： $1.6\text{Pa}$

放電電力： $20\text{W}$

放電周波数： $13.56\text{MHz}$

放電時間： $15\text{sec}$

【0122】②モノマー：酸素（プラズマ処理）

モノマー原料の流量： $1.5\text{sccm}$

温度：室温

HSA抗原濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	5	10	50	250	500	550

成膜サンプルをXPS分析したところカルボキシル基の存在が確認された。

【0124】(実施例19) 実施例1と同様な装置及び方法により実施した。プラズマ重合膜の成膜条件は、モノマー原料としてプロパルギルアミンを用いた以外は、実施例2と同様に設定した。上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路

スカトール濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	4.5	9	45	225	450	495

成膜サンプルをXPS分析したところ1級アミンの存在が確認された。

【0126】(実施例20) 疎水結合の例として以下の実験を行った。透明基板（ガラス板）上に、スパッタリングによりクロム及び金からなる層を形成した。次に金属層の上にモノマーとしてトリフルオロエチレンを用いたプラズマ重合膜を以下の成膜条件にて成膜した。

流量： $1.5\text{sccm}$

温度：室温

圧力： $5\text{Pa}$

HSA抗原濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
RU	3	6	30	150	300	330

(実施例21) 包括法の例として以下の実験を行った。透明基板（ガラス板）上に、スパッタリングによりクロム及び金からなる層を形成した。次に金属層の上にモノマーとしてプロパルギルアルコールを用いたプラズマ重合膜を以下の成膜条件にて成膜した。

流量： $1.5\text{sccm}$

つDNA $7.5\times 10^{-7}\text{M}$ を流して反応させたところ、約400RUのシグナルが得られた。

【0120】

0.0075	0.075	0.75	7.5	75
20	80	400	800	880

圧力： $1.6\text{Pa}$

放電電力： $20\text{W}$

放電周波数： $13.56\text{MHz}$

放電時間： $5\text{sec}$

以上の2段階の工程で目的の表面を得る。

【0123】上記条件の下、プラズマ重合膜の成膜を行った。センサーチップを表面プラズモンバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、流路から $0.5\text{M}$ カルボジイミド溶液を流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、抗HSA抗体（濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ ）も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。この抗HSA抗体に相補的なHSA抗原 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約250RUのシグナルが得られた。

から $0.5\text{M}$ カルボジイミドを流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で10分間測定セルに流し込み、ベヘン酸（濃度 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ ）も同様に流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で流し込み、60分間かけて固定した。このベヘン酸に相補的なスカトール $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を流して反応させたところ、約225RUのシグナルが得られた。

【0125】

0.1	1	10	100	1000
9	45	225	450	495

放電電力： $50\text{W}$

放電周波数： $13.56\text{MHz}$

放電時間： $30\text{sec}$

上記条件で得られたプラズマ重合膜は疎水性を有していた。このプラズマ重合膜上に抗HSA抗体溶液（濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ で60分間フローし、疎水結合にて抗体を固定化した。この抗体固定化プラズマ重合膜にさらにHSAを各濃度作用させたところ、以下の様な結果が得られた。

【0127】

0.1	1	10	100	1000
6	30	150	300	330

温度：室温

圧力： $1.6\text{Pa}$

放電電力： $20\text{W}$

放電周波数： $13.56\text{MHz}$

放電時間： $15\text{sec}$

上記条件で得られたプラズマ重合膜は高い親水性を示し

た。このプロパルギルアルコールプラズマ重合膜上に抗体溶液（濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を均一に塗布し、乾燥後この面に更に下記の条件にてプラズマ処理を行った。

【0128】流量：1.5sccm

温度：室温

圧力：1.6Pa

放電電力：20W

H S A 抗原濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.01	0.1	1	10	100	1000
R U	5	10	50	250	500	550

\* H S A の流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$

【0130】

【発明の効果】本発明の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルを使用した表面プラズモン共鳴バイオセンサーによれば、固定化する物質が少量であっても、良好な感度で検体を測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一例による表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの光学部分の概略断面図である。

【図2】従来の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの光学部分の概略断面図である。

【図3】本発明の他の例による表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの光学部分の概略断面図である。

(a) は抗体の F a b フラグメントを固定化した例、  
(b) は抗体の F ( a b' )<sub>2</sub> フラグメントを固定化した例を示す図である。

【図4】本発明の別の例による表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定セルの光学部分の概略断面図である。

【図5】本発明の一例による表面プラズモン共鳴バイオセンサーの概念図である。

【図6】プラズマ重合膜形成前及び形成後における反射光強度曲線を示すグラフである。

【図7】実施例1で使用するプラズマ重合装置を示す概略図である。

【図8】実施例1における相補鎖DNAの濃度とRUの関係を示す図。

【図9】実施例2における相補鎖DNAの濃度とRUの関係を示す図。

【図10】実施例3における相補鎖DNAの濃度とRUの関係を示す図。

【図11】実施例4における相補鎖DNAの濃度とRUの関係を示す図。

【図12】実施例5におけるH S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【図13】実施例6におけるB S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【図14】実施例7における糖の濃度とRUの関係を示す図。

【図15】実施例8におけるB S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【図16】実施例9におけるB S A 抗原の濃度とRUの

放電周波数：13.56MHz

放電時間：8sec

このようにしてプラズマ重合により抗体を包括、固定化した膜に、H S A を各濃度作用させたところ、以下の様な結果が得られ、検量線を描くことができた。

【0129】

関係を示す図。

【図17】実施例10におけるB S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【図18】実施例11におけるB S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【図19】実施例12におけるH S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【図20】実施例13におけるH S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

20 【図21】実施例14におけるH S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【図22】実施例15におけるH S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【図23】実施例16におけるH S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【図24】実施例17における相補鎖DNAの濃度とRUの関係を示す図。

【図25】実施例18におけるH S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

30 【図26】実施例19におけるスカトールの濃度とRUの関係を示す図。

【図27】実施例20におけるH S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【図28】実施例21におけるH S A 抗原の濃度とRUの関係を示す図。

【符号の説明】

1…透明基板

2…金属薄膜

3…プラズマ重合膜

4…生理活性物質

5…多孔質材料

6…共有結合膜

7…カートリッジブロック

71…測定セル

72, 73…流路

8…光源

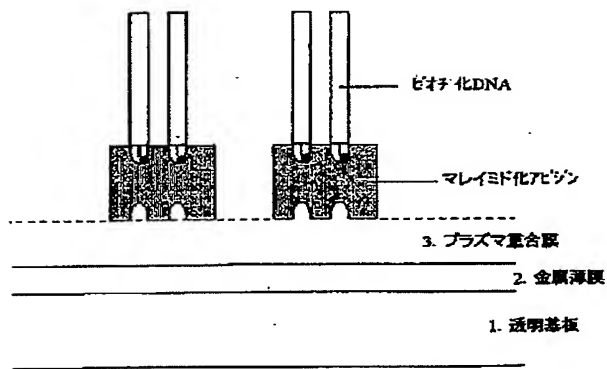
80…入射光

9…検出器

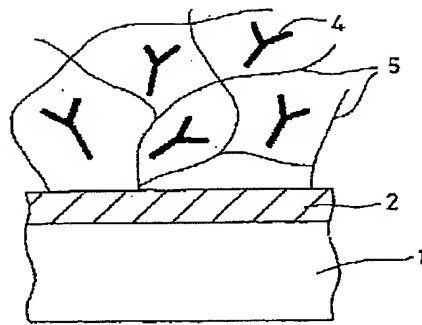
90…反射光

50 10…測定チップ

【図1】

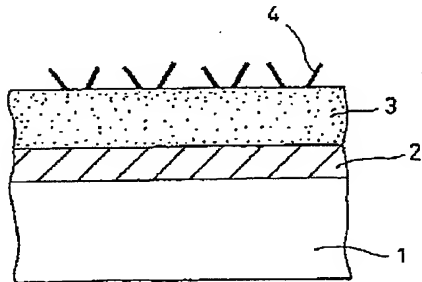


【図2】

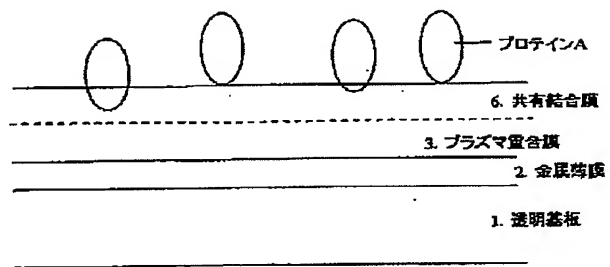


【図3】

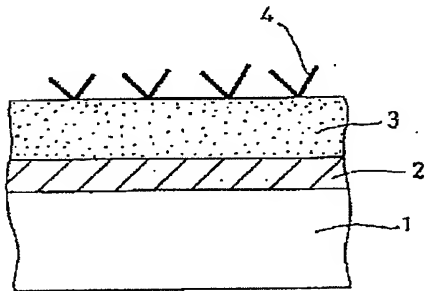
(a)



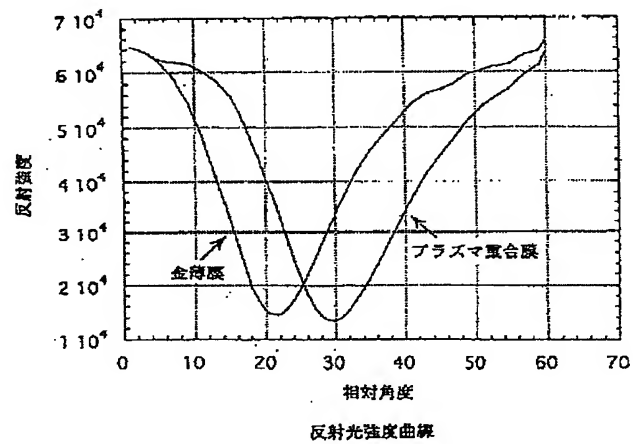
【図4】



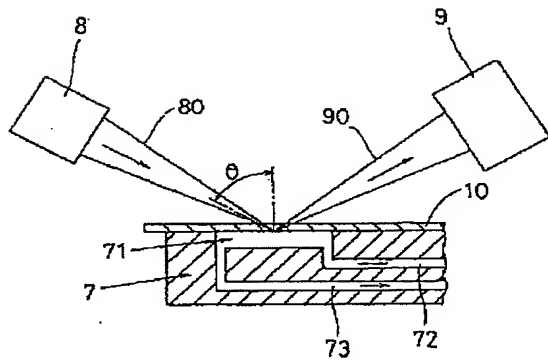
(b)



【図6】

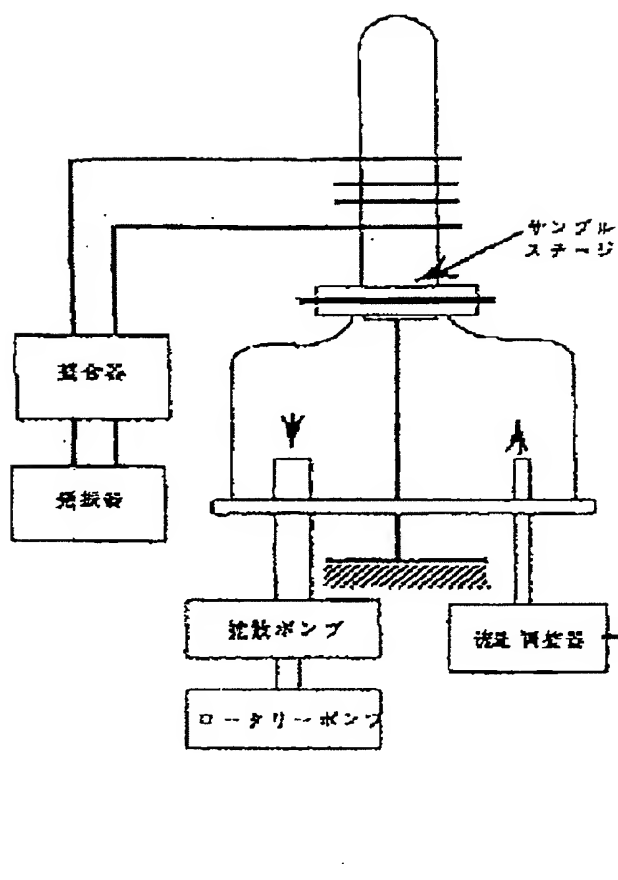


【図5】

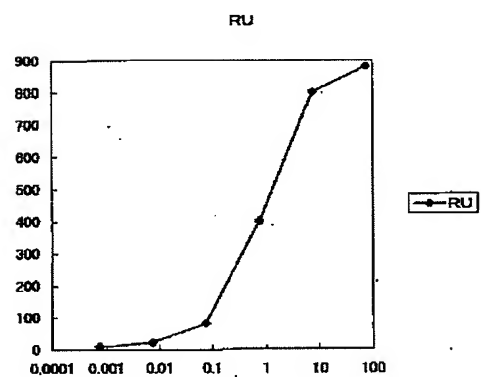




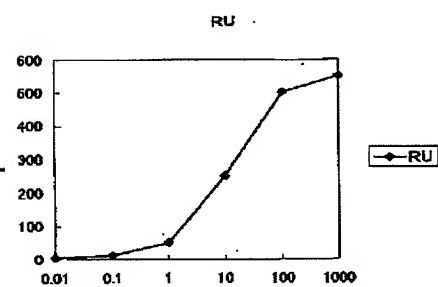
【図7】



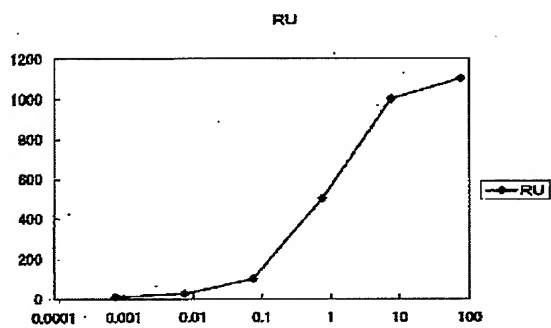
【図9】



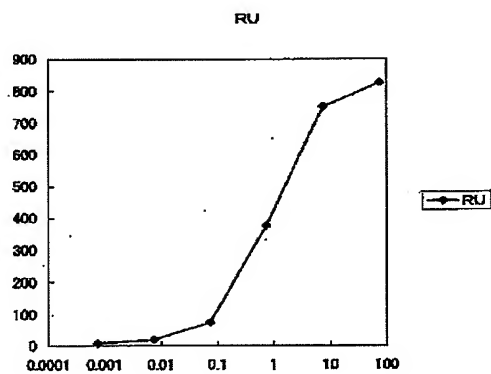
【図12】



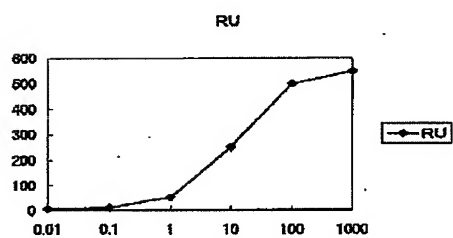
【図8】



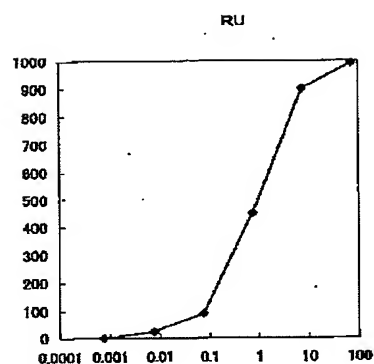
【図10】



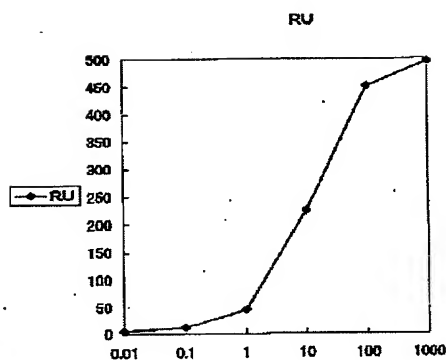
【図22】



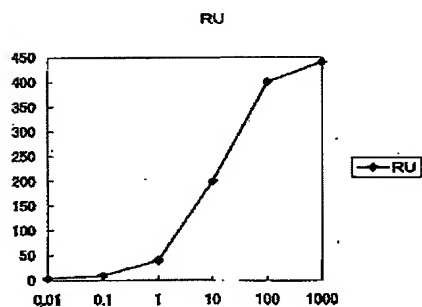
【図11】



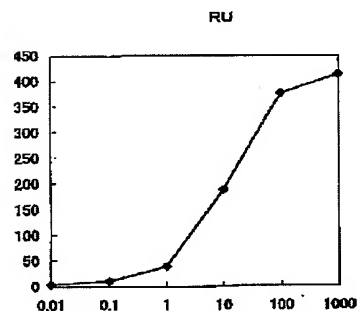
【図13】



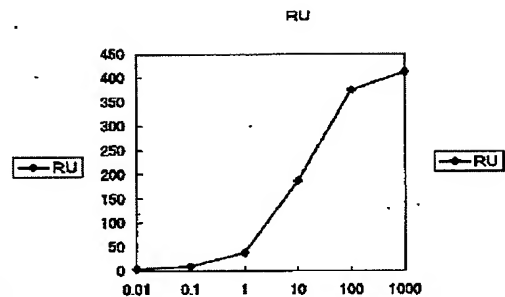
【図14】



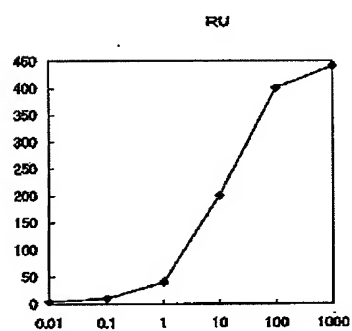
【図15】



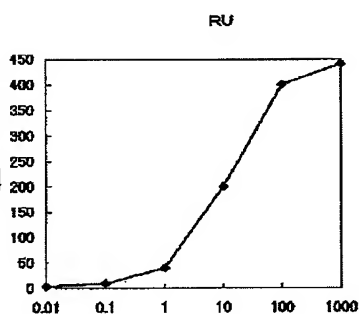
【図18】



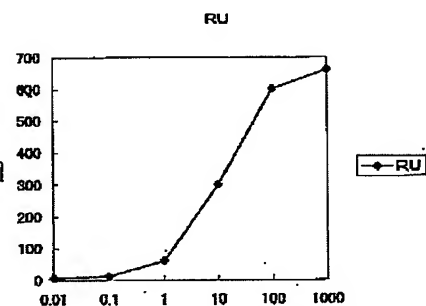
【図16】



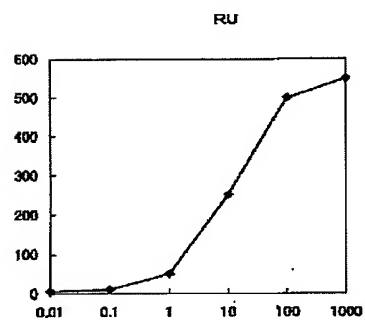
【図17】



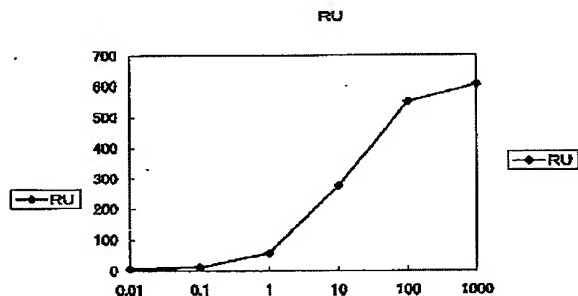
【図21】



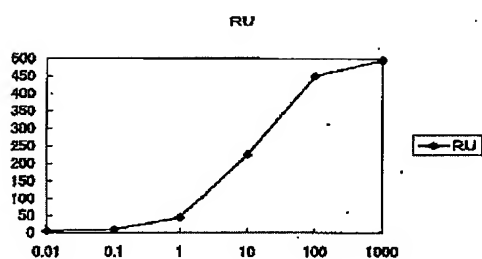
【図19】



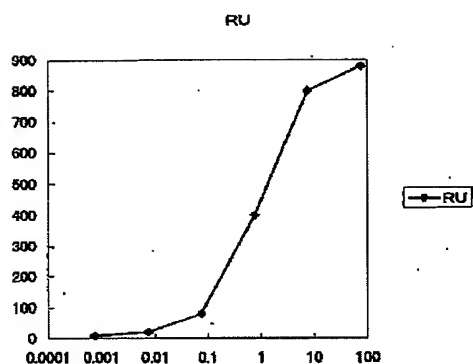
【図20】



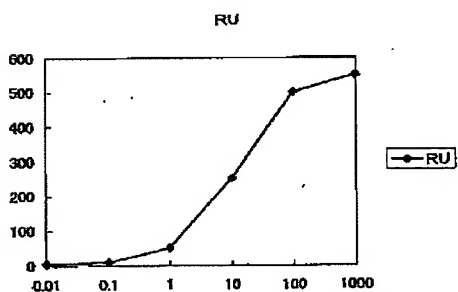
【図 23】



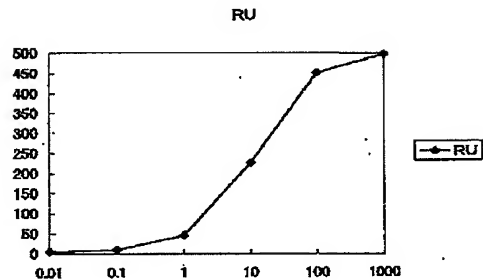
【図 24】



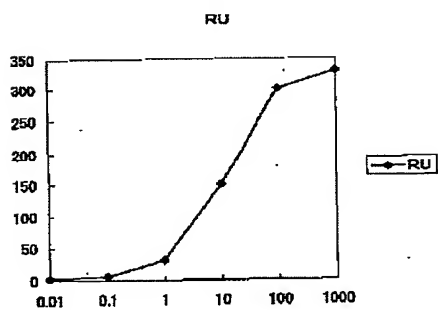
【図 25】



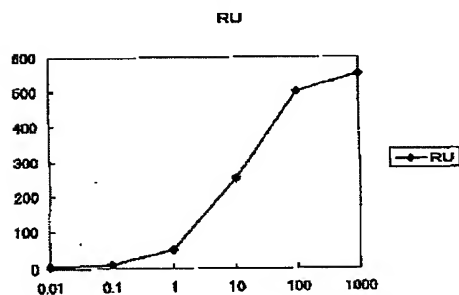
【図 26】



【図 27】



【図 28】



フロントページの続き

(51) Int.C1.<sup>7</sup> 識別記号  
// G O I N 33/545  
33/553

F I  
G O I N 33/545  
33/553

テマコード (参考)  
A

(72)発明者 中村 洋之  
東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号  
大日本印刷株式会社内

(72)発明者 永田 良平  
東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号  
大日本印刷株式会社内

(72)発明者 軽部 征夫  
神奈川県川崎市宮前区東有馬 1 - 3 - 16

(72)発明者 六車 仁志  
高知県香美郡土佐山田町楠目 738 - 5